

## Поверхностная модификация наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4$ производными аминокислот

Дёмин А.М.,<sup>\*а</sup> Уймин М.А.,<sup>б</sup> Мысик А.А.,<sup>б</sup> Ермаков А.Е.,<sup>б</sup> Краснов В.П.<sup>а</sup>

<sup>а</sup> Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, 620041, г. Екатеринбург, ул. С. Ковалевской/Академическая, 22/20, тел.: (343) 362-33-45; E-mail: demin@ios.uran.ru

<sup>б</sup> Институт физики металлов УрО РАН, 620041, г. Екатеринбург, ГСП-170, ул. С. Ковалевской, 18; E-mail: yermakov@imp.uran.ru

Разработаны методы функционализации магнитных наночастиц на основе  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  производными алкоксисилана: 3-аминопропилтриметоксисилана (АПТМС) или 3-аминопропилтриэтоксисилана (АПТЭС), 3-глицидоксипропилтриэтоксисилана (ГПТЭС) и 3-меркаптопропилтриметоксисилана (МПТМС). Изучена возможность последующей модификации поверхности этих частиц производными  $\epsilon$ -аминокапроновой кислоты и L-лизина.

### Введение

В последнее время внимание исследователей в области нанохимии и наномедицины сосредоточено на возможности использования новых материалов для фармацевтической доставки лекарств и визуализирующих диагностических агентов.<sup>1-4</sup> Приоритетными при лечении и диагностике онкологических заболеваний являются в настоящее время такие направления как реализации точечной лазерной и магнитной гипертермии, адресная доставка лекарственных препаратов в составе магнитных фосфолипидных композитов, магнито-резонансная диагностика (МРТ) и другие. Такого рода подходы предполагают использование наноразмерных порошков металлов или оксидов, характеризующихся ферромагнитными свойствами, в первую очередь, на основе железа, его гидроксидов или оксидов ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ).

Ключом к успешному применению магнитных наночастиц является их поверхностная функционализация. Одним из наиболее эффективных методов модификации представляется ковалентное связывание органических молекул с магнитными наночастицами МНЧ.<sup>5-7</sup> Наиболее перспективный из них заключается в нанесении на наночастицы органического слоя, используя функционализированные алкоксисилановые реагенты.<sup>8,9</sup> Алкоксисилан сшивается с образованием кремнийорганического слоя, покрывающего наночастицу, с функциональными группами на поверхности.

В данной работе проведена активация и пошаговая функционализация наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  3-амино-, 3-эпокси- и 3-меркаптотриалкоксисиланом, а также  $\epsilon$ -аминокапроновой кислотой, L-Lys. Такая модификация позволит проводить в дальнейшем конденсацию с различными молекулярными векторами (антителами, ДНК, белками, пептидами), обеспечивающих адресную доставку МНЧ в опухоль, и в перспективе создать высокоэффективные диагностические агенты для МРТ исследований.

### Результаты и обсуждение

Для выполнения работы были использованы МНЧ на основе  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (20-40 нм), полученные газовой фазой методом в Институте физики металлов УрО РАН. На первом этапе работы нами был изучен процесс функционализации поверхности МНЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  АПТМС и АПТЭС (схема 1).<sup>10</sup> Иммунизация аминопропилсилана (за счёт образования ковалентной связи) на МНЧ подтверждена данными ИК-спектроскопии и эмиссионного спектрального анализа с индуктивно связанной плазмой.

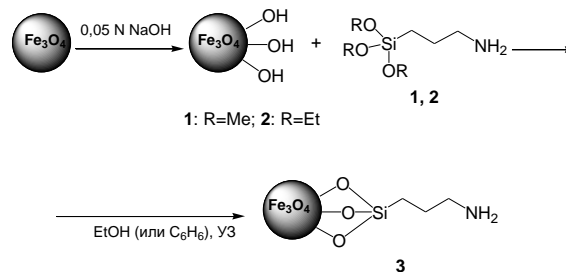


Схема 1

Широкая полоса  $765\text{--}1180\text{ см}^{-1}$  в спектрах нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) модифицированных МНЧ соответствует валентным колебаниям связи Si-O. Отсутствие в данном спектре сильно выраженной полосы  $1071\text{ см}^{-1}$ , присутствующей в спектре исходного АПТМС и соответствующей валентным колебаниям связи Si-O, и наличие полос  $1095$ ,  $1022$  и  $927\text{ см}^{-1}$ , которые, в свою очередь, отсутствуют в спектре исходных МНЧ, свидетельствует об образовании в процессе реакции связей Si-O-Fe и Si-O-Si.

Реакция конденсации алкоксисилана наиболее эффективно протекает в полярных растворителях (95 %  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  или смеси  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:1)). Максимальная степень модификации наночастиц достигается при использовании 2,5-3,0 ммоль алкоксисилана в расчёте на 1 г МНЧ. Также было показано, что степень иммобилизации аминопропилсилана (АПС) при использовании

АПТМС и АПТЭС оказалась сходной (0,6-0,8 ммоль/г). Удельная намагниченность полученных порошков составляла  $61 \pm 2 \text{ Ам}^2/\text{кг}$ .

В ходе работы нами разработана методика выполнения измерений количества АПС от 0,320 до 3,03 ммоль/г на поверхности химически модифицированных МНЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  методом ИК-спектроскопии. Методика основана на сопоставлении отношений площадей полос колебаний связей Fe-O наноматериала и связей Si-O материала покрытия с результатами измерения массовой доли кремния в исследуемом нанокompозите методом АЭС. Количество АПС на поверхности химически модифицированных МНЧ определяют по градуировочному графику.<sup>10</sup>

Реакции силинизации с использованием ГПТЭС и МПТМС были проведены в условиях аналогичных условиям реакции силинизации с использованием АПТМС и АПТЭС (схема 2).<sup>11,12</sup> Имобилизация глицидоксипропилсилана (ГПС) и меркаптопропилсилана (МПС) на МНЧ подтверждена данными ИК-спектроскопии и эмиссионного спектрального анализа с индуктивно связанной плазмой. Изменение в ИК-спектре продукта характеристик полос поглощения, свойственных исходным компонентам реакции, (по аналогии с АПС-модифицированными МНЧ) подтверждает образование ковалентной связи между ГПС или МПС и поверхностью наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

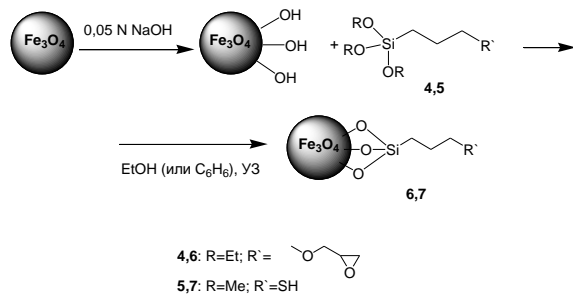


Схема 2

Согласно данным трансмиссионной электронной микроскопии для образцов ГПС-модифицированных МНЧ существенных изменений в морфологии частиц не происходит. В случае МПС-модифицированных МНЧ в ряде случаев наблюдалась значительно развитая за счёт органических молекул поверхность, в том числе, наблюдались МНЧ, агломерация которых произошла за счёт органической фазы. Это объясняется высокой склонностью меркаптогруппы МПС к окислению кислородом воздуха, что ведёт к образованию дисульфидных производных и разрастанию в дальнейшем органического покрытия толщиной до 10 нм.

Реакция силинизации наиболее эффективно протекает в полярных растворителях (95 %  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  или смеси  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:1)). Максимальная степень модификации поверхности МНЧ в случае использования ГПТЭС и МПТМС достигается при использовании 1,0-1,5 ммоль алкоксисилана в расчёте на 1 г МНЧ. Если в случае увеличения количества ГПТЭС степень функционализации поверхности МНЧ не увеличивается, то при повышении количества МПТМС происходит

значительное увеличение толщины органического слоя и агломерация МНЧ (концентрация МПС достигала 4,2 ммоль/г)

В случае АПС-модификации МНЧ были получены образцы МНЧ, содержащие на поверхности до 0,8 ммоль силианового производного на 1 г МНЧ; в случае ГПС-модифицированных МНЧ количество 3-глицидоксисилана составляло порядка 0,3 ммоль/1г МНЧ; при использовании МПТМС уровень модификации оказался наибольшим – до 2,1 ммоль/1г, что превосходит показатели, описанные в зарубежной литературе. Полученные ГПС- и МПС-модифицированные наночастицы обладают высокими магнитными свойствами ( $59 \pm 2 \text{ Ам}^2/\text{кг}$ ).

На следующем этапе работы была проведена конъюгация АПС-модифицированных МНЧ с N-Вос-аминокапроновой кислотой (8),  $\text{N}^\alpha, \text{N}^\epsilon$ -Вос-L-Lys (9), N-TFA-аминокапроновой кислотой (10),  $\text{N}^\alpha, \text{N}^\epsilon$ -TFA-L-Lys (11), N-Fmoc-аминокапроновой кислотой (12) и  $\text{N}^\alpha, \text{N}^\epsilon$ -Fmoc-L-Lys (13) (схема 3).

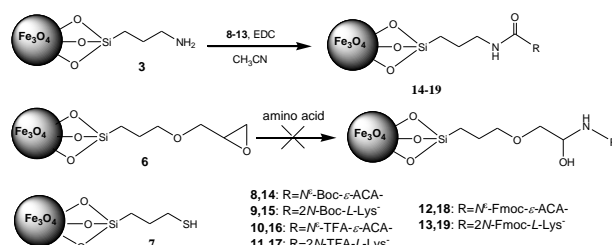


Схема 3

На основании данных ИК-спектроскопии наиболее эффективно реакция конденсации протекает в хлористом метиле или ацетонитриле. Наличие в спектрах продуктов реакции полос, характерных для исходных соединений, но претерпевших сдвиги, свидетельствует о ковалентном связывании аминокислот с аминогруппами на поверхности МНЧ. По степени их интенсивности в спектрах можно качественно судить о степени протекания реакции. Для примера на рис. 1 представлены спектры НПВО нанокompозитов, содержащих N-Вос-аминокапроновую кислоту 14.

Характерными полосами для наноконъюгатов, содержащих производные аминокислот, являются полосы в интервале  $1650\text{-}1700 \text{ см}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$  (амид I)), соответствующие колебаниям карбонильных групп, а также группа полос в интервале  $1100\text{-}1250 \text{ см}^{-1}$ , соответствующих колебаниям амидных связей ( $\text{CONH}$  (амид III)).

В ходе работы были предприняты попытки осуществить аналогичную конъюгацию с использованием ГПС-модифицированных МНЧ, однако на данном этапе работы подобрать условий реализации данной реакции не удалось.

Таким образом, в ходе исследования были найдены и оптимизированы условия ковалентной модификации силиновыми производными МНЧ на основе  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , а также исследована возможность их дальнейшей модификации аминокислотами, что позволит получить нанокompозиты на основе  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , содержащие на поверхности ковалентно связанные молекулярные вектора, потенциальные агенты для МРТ-диагностики.

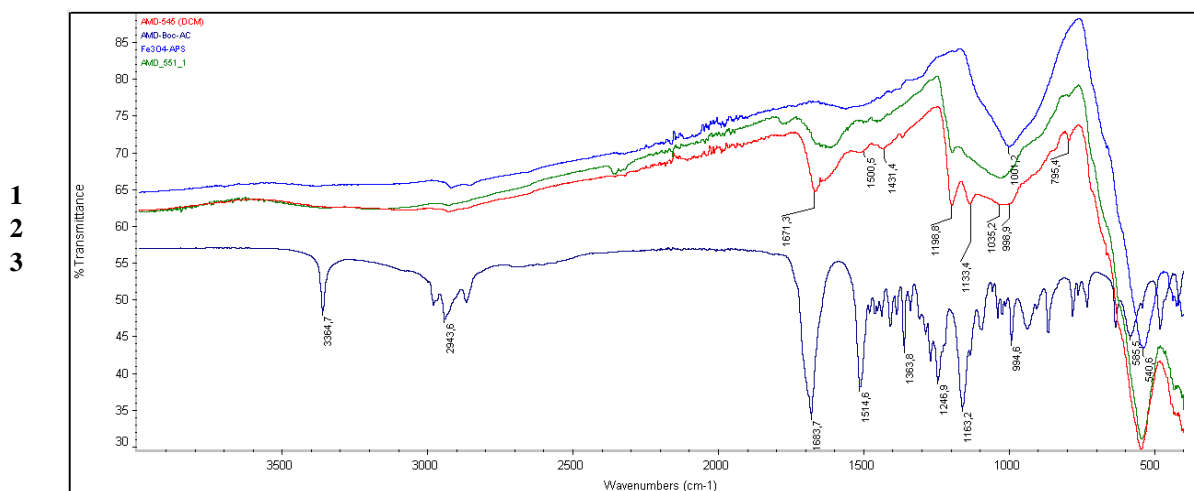


Рис. 1. ИК спектры исходных АПС-модифицированных МНЧ (1), МНЧ, содержащие N-Вос-аминокапроновую кислоту **14** (2, верхняя линия – продукт реакции в ДМФА, нижняя линия – в хлористом метиле), и исходную N-Вос-аминокапроновую кислоту **14** (3)

## Экспериментальная часть

МНЧ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (20-40 нм) получены методом газофазного синтеза в ИФМ УрО РАН. Имобилизация производных пропилсилана на МНЧ подтверждена данными ИК-спектроскопии при использовании инфракрасного Фурье-спектрометра «Nicolet 6700». Массовая доля кремния определялась методом атомно-эмиссионной спектроскопии на оптическом эмиссионном спектрометре «iCAP6300 Duo» с индуктивно связанной плазмой. Удельная намагнитченность порошков модифицированных МНЧ измерялась на вибромагнитометре с магнитным полем в поле до 2,2 МА/м в Институте физики металлов УрО РАН.

### Активация МНЧ.

Исходные МНЧ помещали в колбу с 0,05 N NaOH (концентрация 2 мг МНЧ/мл раствора NaOH). Суспензию нагревали до 65 °С в течение 5 ч и оставляли на ночь. Для полного осаждения МНЧ использовали внешнее магнитное поле и центрифугирование (10 мин, 15 тыс.об./с). Водную фазу удаляли, МНЧ промывали водой до pH 7 и ацетоном, сушили под вакуумом.

### Модификация МНЧ аминопропилсиланом (глицидоксид- или меркаптопропилсиланом).

Наночастицы на основе  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (20-40 нм) помещали в круглодонную колбу, добавляли органический растворитель (этанол, бензол) до достижения концентрации 2 мг/мл и облучали в УЗ-ванне (ПСБ-2835-05, 35кГц, 100 Вт) в течение 10 мин. для получения однородной суспензии. К полученной суспензии добавляли алкоксисилановый реагент (АПТМС, АПТЭС, ГПТЭС или МПТМС) в количестве 2,5 ммоль АПТМС (или АПТЭС) в расчёте на 1 г МНЧ (или 1,0-1,5 ммоль ГПТЭС и МПТМС в расчёте на 1 г МНЧ) и перемешивали в течение 16-20 ч., а затем осаждали модифицированные МНЧ при использовании внешнего магнитного поля. Органический раствор декантировали, МНЧ промывали соответствующим растворителем (четырьмя порциями) и ацетоном

(один раз), сушили под вакуумом. Целевой продукт представлял собой коричневый порошок.

### Модификация МНЧ производных L-лизина и ε-аминокапроновой кислоты.

МНЧ, функционализированные 3-аминопропилсиланом, помещали в круглодонную колбу, добавляли органический растворитель (ацетонитрил или ДМФА) до достижения концентрации 2 мг/мл и облучали в УЗ-ванне в течение 10 мин. для получения однородной суспензии. К суспензии при перемешивании добавляли двукратный мольный избыток аминокислоты в расчёте на количество, загруженного на поверхность МНЧ аминопропилсилана,<sup>10</sup> и конденсирующий реагент (EDC) в эквимольном количестве. Перемешивание продолжали 16-20 ч. после чего модифицированные МНЧ осаждали при использовании внешнего магнитного поля. Органический раствор удаляли, МНЧ промывали соответствующим растворителем (четырьмя порциями) и ацетоном (один раз), сушили под вакуумом. Целевой продукт представлял собой коричневый порошок.

Работа выполнена при финансовой поддержке УрО РАН (проект № П-23-2001 и № 09-И-3-2004), а также в рамках Государственной программы поддержки ведущих научных школ (грант НШ 65261.2010.3), и грантом РФФИ Урал № 10-03-96003-р\_урал\_a.

## Библиографический список

- 1 Sanchez C., Belleville P., Popall M., Nicole L. // Soc. Rev. 2011. V. 40. P. 696.
- 2 Faraji A. H., Wipf P. // Bioorg. Med. Chem. 2009. V. 17. P. 2950.
- 3 Gao J., Gu H., Xu B. // Acc. Chem. Res. 2009. V. 42, No 8. P. 1097.
- 4 Schmid G., editor. Nanoparticles: From theory to applications. Weinheim: Wiley-VCH. 2004. 434 p.
- 5 Bruce I.J., Sen T. // Langmuir. 2005. V.21. P.7029.
- 6 Mikhaylova M., Kim D.K., Berry C.C. // Chem. Mater. 2004. V.16. P. 2344.
- 7 Kohler N., Fryxell G.E., Zhang M. // J.Am.Chem.Soc. 2004. V.126. P. 7206.

#### **МАТЕРИАЛЫ XIV МОЛОДЕЖНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ПО ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

- 8 Srinivasan B., Huang X. // *Chirality*. 2008. V.20. P. 265.
- 9 Ma M., Zhang Y., Yu W., et. al. // *Colloids Surf. A*. **2003**. V.212. P. 219.
- 10 Дёмин А.М., Корякова О.В., Уймин М.А., Мысик А.А., Ермаков А.Е., Краснов В.П. // *Статья в сборнике статей по материалам II Международной конференции "Техническая химия. От теории к практике"*, г. Пермь. **17 - 21 мая 2010 г.** С. 196.
- 11 Дёмин А.М., Стасик А.А., Корякова О.В., Уймин М.А., Мысик А.А., Ермаков А.Е., Краснов В.П. // *International Symposium on Advanced Science in Organic Chemistry, Miskhor, Crimea*. **June 21-25, 2010**. P. У-18.
- 12 Дёмин А.М., Корякова О.В., Уймин М.А., Мысик А.А., Ермаков А.Е., Краснов В.П. // *Российский биотерапевтический журнал*. **2010**. Т.9, № 3. С. 9.